

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 757–760

Peroxidase aus Meerrettich:

Reagens zum Abstoppen der katalytischen Umsetzung der Substrate H_2O_2 und 2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS)

Von H. Gallati und H. Brodbeck

Zentrale Forschungseinheiten der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 5. Februar/14. Juni 1982)

Zusammenfassung: Durch Zusatz von sekundärem Alkylsulfat (Teepol®-610) oder Natrium-Dodecylhydrogensulfat zur Peroxidase wird die katalytische Umsetzung der Substrate H_2O_2 und 2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS) sogleich und vollständig abgestoppt. Die entstandene Farbintensität des oxidierten ABTS⁺ wird dadurch stabilisiert und kann innerhalb von 60 Minuten photometrisch bestimmt werden. Diese Abstoppreagenzien haben vor allem bei den enzym-(Peroxidase)-immunologischen Bestimmungen nach der ELISA-Technik praktische Bedeutung, muß doch wegen der Heterogenität des Testsystems und wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit die katalytische Aktivität des Indikatorenzylms nach der Zwei-Punkt-Methode gemessen werden.

Horseradish peroxidase:

Reagent for stopping the catalytic conversion of the substrates H_2O_2 and 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid-(6)) (ABTS)

Summary: Catalytic conversion of H_2O_2 and 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid-(6)) (ABTS) by peroxidase is stopped immediately and completely by the addition of a secondary alkyl sulphate (Teepol®-610) or sodium dodecyl hydrogensulphate. The resulting colour intensity of the oxidized ABTS⁺ is thereby stabilized and can be determined photometrically within 60 min. These stop reagents have special practical importance for the enzyme-(peroxidase)-immunological determination by the ELISA technique; but the activity of the indicator enzyme must be measured by the two point method, owing to the heterogeneity of the test system and the slow reaction rate.

Einführung

Bei den enzym-immunologischen Bestimmungen nach der ELISA-Technik muß wegen der Heterogenität des Testsystems sowie wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit die katalytische Aktivität des Indikatorenzylms nach der Zwei-Punkt-Methode bestimmt werden. Dabei ist es von praktischem Nutzen, wenn die Enzymreaktion nach Ablauf der Inkubationszeit abgestoppt und anschließend innerhalb einer gewissen Zeit die stabilisierte Farbintensität bestimmt werden kann.

Peroxidase aus Meerrettich (Donor: hydrogenperoxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7) wird häufig für die enzym-immunologischen Tests als Markierungs- und Indikator-enzym eingesetzt. Die Peroxidaseaktivität kann einfach, spezifisch und sensitiv mit den Substraten H_2O_2 und 2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS) gemessen werden (1).

Für dieses enzymatische Reaktionssystem sollte ein Abstopp-Reagens gefunden werden, das folgende Bedingungen erfüllt:

- Die Peroxidase muß nach Zugabe des Abstopp-Reagens sogleich und vollständig inaktiviert werden.
- Die entstandene Farbintensität darf durch Zugabe des Abstopp-Reagens nicht wesentlich vermindert werden, und sie muß bei der gewählten Inkubationstemperatur 30–60 Minuten stabil sein.
- Das Abstopp-Reagens soll eine gute Praktikabilität aufweisen.

Diese Bedingungen werden vor allem vom sekundären Alkylsulfat (Teepol®-610) wie auch vom Natrium-Dodecylhydrogensulfat erfüllt. Die entsprechenden experimentellen Daten werden in dieser Arbeit mitgeteilt.

Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien waren analysenrein. Peroxidase aus Meerrettich (Reinheitsgrad I, Lyophilisat) sowie 2,2'-Azino-di(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS) wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Zum Abstoppen der Peroxidaseaktivität wurden folgende spezielle Reagenzien untersucht: Sekundäres Alkylsulfat (Teepol®-610) von der Shell/Chemie, Dodecylhydrogensulfat-Natriumsalz, Natriumazid und Natriumfluorid von Merck, Natrium-Dextran-sulfat 2000 von Pharmacia, Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglycol), Tween-20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat) und Brij-35 (Polyoxyethylen-Laurylether) von der Fluka und H_2O_2 von der Firma Lehner, Muttentz.

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität mit den Substraten H_2O_2 und ABTS (1) werden in einer Meßzelle von 10 mm Schichtdicke zu 2,0 ml Peroxidase-Testlösung (0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat vom pH 4,2 mit 2,0 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l H_2O_2) 0,05 ml Peroxidaselösung zugemischt und bei 25 °C die Absorptionzunahme photometrisch bei der Wellenlänge 405 nm gemessen.

Zum Abstoppen der katalytischen Reaktion werden 0,2 ml der entsprechenden Reagenzienlösung zur Peroxidase-Substratmischung zugegeben und anschließend während 30–60 Minuten die Stabilität der Farbintensität überprüft. Die Gehaltsangaben für die Abstopp-Reagenzien beziehen sich jeweils auf die Endkonzentration in der Testlösung, also auf 2,2 ml.

Resultate und Diskussion

Sekundäres Alkylsulfat (Teepol®-610) als Abstopp-Reagens

Teepol®-610, ein anionisches Detergens, ist eine neutrale, wäßrige Lösung mit 342 g/l sekundärem Alkylsulfat.

Sekundäres Alkylsulfat in einem Konzentrationsbereich von 4–20 g/l vermag die katalytische Aktivität der Peroxidase sogleich und vollständig abzustoppen und die entstandene Farbintensität des oxidierten ABTS[•] während mindestens 60 Minuten stabil zu halten (Abb. 1).

Sekundäres Alkylsulfat ist mit destilliertem Wasser gut mischbar und kann daher zum Abstoppen der Peroxidaseaktivität in einer entsprechend hohen Konzentration der Testlösung zugemischt werden. Auf diese Weise wird der Verdünnungseffekt und die damit verbundene Verminderung der Farbintensität klein gehalten.

In Tabelle 1 ist die Hemmwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von sekundärem Alkylsulfat auf die Peroxidaseaktivität zusammengefaßt. Sekundäres Alkylsulfat ist demnach ein potenter Peroxidase-Inhibitor und stoppt schon bei einer Konzentration von 4 g/l die katalytische Reaktion vollständig ab.

Die mit sekundärem Alkylsulfat inaktivierte Peroxidase kann durch einen Dialyseschritt nicht reaktiviert werden. Dabei muß die Frage offen bleiben, ob das sekundäre Alkylsulfat das Häm-Eisen der Peroxidase abspaltet und als Alkylsulfat-Eisen-Komplex aus dem Dialyserschlauch herausdiffundiert, oder ob es sich ans Häm-Eisen anlagert und dadurch die Peroxidase inaktiviert.

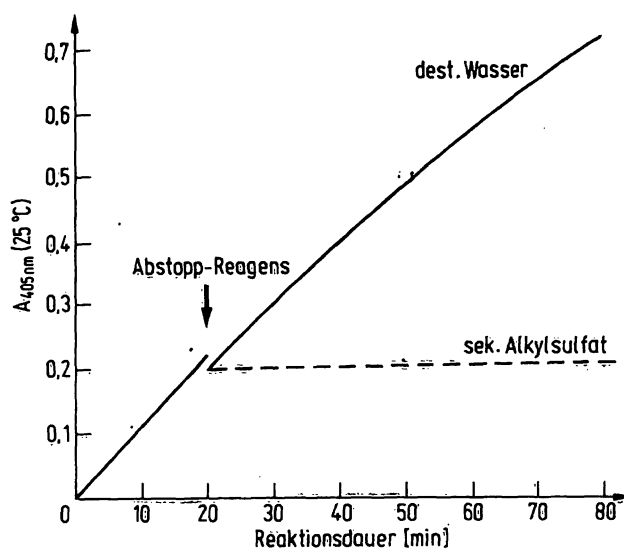


Abb. 1. Peroxidaseaktivität vor und nach Zugabe von sekundärem Alkylsulfat. Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C werden 80 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat von pH 4,2 mit 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l H_2O_2 in einer Meßzelle von 10 mm Schichtdicke inkubiert und die Absorption bei der Wellenlänge 405 nm während 20 Minuten verfolgt. Anschließend werden zu je 2,0 ml dieser Testlösung 0,2 ml einer 100 g/l sekundären Alkylsulfatlösung (---) resp. 0,2 ml dest. Wasser (—) zugemischt und während weiteren 60 Minuten die Absorption bei 405 nm gemessen.

Die Hemmwirkung des sekundären Alkylsulfats auf die Peroxidaseaktivität ist wesentlich abhängig von den Reaktionsbedingungen. Mit den Substraten H_2O_2 und *o*-Phenylendiamin bei einem pH-Wert von 5,0 ist die Alkylsulfat-Hemmwirkung wesentlich vermindert, und mit den Substraten H_2O_2 , Phenol und 4-Aminoantipyrin bei einem pH-Wert von 7,25 („Trinder-Reagens“ (2)) wird die Peroxidase durch sekundäres Alkylsulfat in einem Konzentrationsbereich bis 20 g/l praktisch nicht gehemmt.

Tab. 1. Einfluß von sekundärem Alkylsulfat auf die Peroxidaseaktivität.

In 0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat von pH 4,2 wird die Aktivität von 80 ng/l Peroxidase in Anwesenheit von 2 mmol/l ABTS, 2,5 mmol/l H_2O_2 und unterschiedlichen Konzentrationen von sekundärem Alkylsulfat bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C photometrisch gemessen. Als Resultat wird die Absorptionzunahme innerhalb von 30 Minuten ($\Delta A_{405 \text{ nm}}/30 \text{ min}$ bei 25 °C) angegeben.

Sekundäres Alkylsulfat (Endkonzentration in g/l)	$\Delta A_{405 \text{ nm}}/30 \text{ min}$ (25 °C)
20	0,000
4	0,000
0,8	0,030
0,16	0,120
0,032	0,450
ohne	0,620

Teepol®-610 wird bei der Bestimmung von Eisen im Serum zur Abspaltung des Eisens vom Transferrin eingesetzt (3, 4). Diese Eisenabspaltung ist pH-abhängig und wird durch Erhöhung des pH-Wertes stark verzögert. Allgemein stört Hämoglobin die Eisenbestimmung im Serum nicht, da unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (pH 5,8) das Porphyrin-Eisen durch Teepol®-610 nicht herausgelöst wird. Daß die Peroxidase, die ebenfalls ein Hämprotein ist, durch Teepol®-610 gehemmt wird, kann dadurch erklärt werden, daß entweder beim pH-Wert der Testlösung (pH 4,2) das Porphyrin-Eisen durch das sekundäre Alkylsulfat abgespalten wird, oder daß die katalytische Aktivität der Peroxidase durch Anlagerung des sekundären Alkylsulfats ans Häm-Eisen gehemmt wird.

Dodecylhydrogensulfat als Abstopp-Reagens

Auch mit Dodecylhydrogensulfat (Natriumsalz) in einem Konzentrationsbereich von 1–5 g/l kann die peroxidatische Aktivität sogleich und vollständig abgestoppt und die Farbintensität des umgesetzten ABTS⁺ während 60 Minuten stabil gehalten werden. In Tabelle 2 ist die Hemmung der Peroxidaseaktivität in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an Natrium-Dodecylhydrogensulfat zusammengefaßt. Dodecylhydrogensulfat, das bei Raumtemperatur eine gute Wasserlöslichkeit (100 g/l) aufweist, fällt bei 2–8 °C schon bei geringen Konzentrationen aus.

In einer weiteren Versuchsserie wurde abgeklärt, ob Detergenzien im allgemeinen oder Substanzen mit einer Sulfatgruppe im besonderen die Peroxidase inaktivieren. Dabei hat sich gezeigt, daß Triton X-100 (untersucht bis 40 g/l in der Testlösung), Tween-20 (– bis 40 g/l –), Brij-35 (– bis 30 g/l –), Dimethylbenzolsulfonsäure (– bis 2 g/l –), Natriumsulfat (– bis 500 mmol/l –), Dextransulfat 2000 (– bis 25 g/l –) und Dimethylsulfat (– bis 50 g/l –) die peroxidatische Aktivität nicht vollständig abzustoppen vermögen.

Tab. 2. Einfluß von Natrium-Dodecylhydrogensulfat auf die Peroxidaseaktivität.

In 0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat von pH 4,2 wird die Aktivität von 80 ng/l Peroxidase in Anwesenheit von 2 mmol/l ABTS, 2,5 mmol/l H₂O₂ und unterschiedlichen Konzentrationen von Dodecylhydrogensulfat bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C photometrisch gemessen. Als Resultat wird die Absorptionzunahme innerhalb von 30 Minuten ($\Delta A_{405\text{nm}}/30\text{ min}$ bei 25 °C) angegeben.

Natrium-Dodecylhydrogensulfat $\Delta A_{405\text{nm}}/30\text{ min}$ (25 °C)
(Endkonzentration g/l)

5,0	0,000
1,0	0,000
0,2	0,130
0,04	0,550
ohne	0,635

Andere Substanzen als Abstopp-Reagenzien

Wasserstoffperoxid bildet mit Peroxidase aus Meerrettich einen stabilen und enzymatisch inaktiven Komplex (5–7). Entsprechende Versuche haben ergeben, daß unter den gegebenen Reaktionsbedingungen mit einer 0,15 mol/l H₂O₂-Konzentration die Peroxidase sogleich und vollständig inaktiviert und die Farbintensität des oxidierten ABTS⁺ während 50 Minuten stabilisiert wird. Mit höheren H₂O₂-Konzentrationen bleicht die Farbe langsam aus, während bei geringerem H₂O₂-Gehalt die peroxidatische Aktivität nicht sogleich oder nicht vollständig abgestoppt wird (Abb. 2).

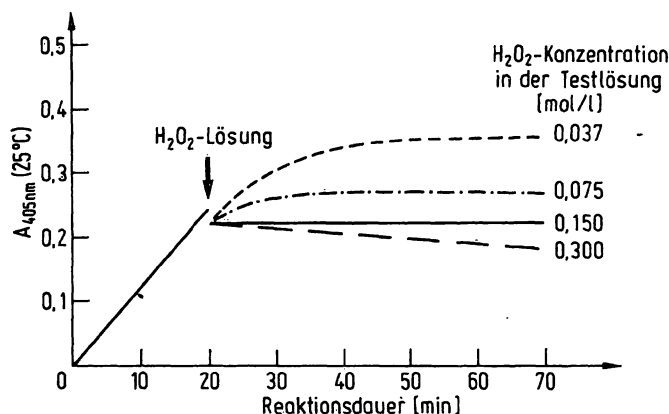


Abb. 2. Peroxidaseaktivität vor und nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid. Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C werden 80 ng/l Peroxidase in 0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat von pH 4,2 mit 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l H₂O₂ in einer Meßzelle von 10 mm Schichtdicke inkubiert und die Absorption bei der Wellenlänge 405 nm während 20 Minuten gemessen. Anschließend wird der Testlösung eine entsprechende H₂O₂-Menge zugemischt und während weiteren 50 Minuten die Absorption bei 405 nm verfolgt.

H₂O₂ ist als Abstopp-Reagens für die Peroxidaseaktivität nicht zu empfehlen. Der optimale Konzentrationsbereich zur sofortigen und vollständigen Inaktivierung des Enzyms und zur Stabilisierung des ABTS⁺ ist zu eng. Zudem muß dieses aggressive Reagens mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden.

Natriumazid, das mit Schwermetallen stabile Komplexe bildet, hemmt schon in kleinsten Konzentrationen die Peroxidase (8) wie auch andere Porphyrin-Enzyme (9, 10). Eine sofortige und vollständige Inaktivierung der Peroxidase wird mit einer Natriumazid-Konzentration von 100–500 mg/l in der Testlösung erreicht. Die Farbintensität des oxidierten ABTS⁺ bleibt unter diesen Reaktionsbedingungen während mindestens 60 Minuten stabil.

Wegen seiner Explosionsgefahr in Verbindung mit Schwermetallen ist Natriumazid als Abstopp-Reagens nicht zu empfehlen.

Fluoridionen, die mit dreiwertigem Eisen einen stabilen Komplex bilden, hemmen die Peroxidaseaktivität schon

in kleinsten Konzentrationen. Für eine sofortige und vollständige Inaktivierung der Peroxidase sind allerdings Fluoridionen in einer Konzentration von mindestens 100 mmol/l in der Testlösung notwendig.

Da unter den gegebenen Reaktionsbedingungen Flußsäure entsteht, die das Glas der Reaktionsgefäße wie der Photometerküvetten anätzt, ist das Natriumfluorid als Abstopp-Reagens für die Peroxidase nicht geeignet.

Einsatz des sekundären Alkylsulfats bei einem enzym-immunologischen Test

Nach der immunologischen Reaktion von Humanoglobulin mit dem an die Innenwand des Teströhrchens

adsorbierten ersten Antikörpers und dem mit Peroxidase markierten, gelösten, zweiten Antikörpers wird das nicht gebundene Material entfernt. Zur Bestimmung der immunologisch gebundenen Peroxidase werden ins Teströhrchen 2,0 ml Testlösung (0,1 mol/l Natriumacetat und 0,05 mol/l Natriumhydrogenphosphat von pH 4,2 mit 2 mmol/l ABTS und 2,5 mmol/l H_2O_2) pipettiert und während 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach Abschluß dieser Reaktionsdauer werden in jedes Teströhrchen 0,2 ml einer wäßrigen, 100 g/l sekundären Alkylsulfatlösung zugemischt und die Farbintensität innerhalb von 60 Minuten bei der Wellenlänge 405 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen.

Literatur

1. Gallati, H. (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1-7.
2. Gallati, H. (1977) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 699-703.
3. Sanford, R. (1963) J. Clin. Pathol. 16, 174-177.
4. Lauber, K. (1965) Z. klin. Chem. 3, 96-99.
5. Maehly, A. C. (1955) „Plant Peroxidase“ in: Methods in Enzymology (Colowick S. & Kaplan N. eds.) New York, Bd. 2, 801-813.
6. Yamazaki, I., Yokota, K. & Nakajima, R. (1965) in: „Oxidases Related Redox Systems“ (King, T., Mason, H. & Morrison, M., eds.), New York, 485-504.
7. Shindler, J., Childs, R. & Bardsley, W. (1976) Eur. J. Biochem. 65, 325-331.
8. Persijn, J. P. & Jonker, K. M. (1978) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 531-532.
9. Slykhouse, T. O. & Fee, J. A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5472-5477.
10. Misra, H. P. & Fridovich, I. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 317-322.

Dr. H. Gallati
Zentrale Forschungseinheiten
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.
Grenzacherstr. 124
CH-4002 Basel